

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Nina Mezedi

MIKROBIOLOŠKA KONTAMINACIJA POVRŠINA I
PREDMETA OPĆE UPORABE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 2014.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA
diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane
Katedra za mikrobiologiju
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Mikrobiologija hrane

Tema rada je prihvaćena na VII. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite održanoj 17. 05. 2013.
godine

Mentor: izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović
Pomoć pri izradi: Vedran Gradvol, dipl. ing.

Mikrobiološka kontaminacija površina i predmeta opće uporabe
Nina Mezedi, 159/DI

Sažetak: U radu je istražena mikrobna populacija površina sjedala WC-a, novčanica i računalnih tipkovnica. Određen je broj bakterija roda *Streptococcus/Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, koliformnih bakterija, enterobakterija, aerobnih, mezofilnih bakterija i plijesni i kvasaca te bakterija roda *Salmonella* i vrste *Escherichia coli*. Ukupno je istraženo 19 uzoraka sjedala WC-a, 7 računalnih tipkovnica i 12 papirnatih novčanica. Bakterije roda *Enterococcus* i vrsta *Staphylococcus aureus* su češće prisutni na sjedalima WC-a ženske populacije. Aerobne, mezofilne bakterije su prisutne u gotovo tri puta većem broju na sjedalima muške populacije (127 stanica/cm² prema 50 stanica/cm²). Broj koliformnih bakterija, enterobakterija te plijesni i kvasaca je zanemariv na analiziranoj površini. Na analiziranim novčanicama i računalnim tipkovnicama najzastupljenija skupina bakterija su enterokoki, potom vrsta *Staphylococcus aureus*. Niti u jednom uzorku nije utvrđena prisutnost bakterija roda *Salmonella* i *Escherichia coli*. Niti jedna analizirana površina ili predmet ne predstavlja opasnost za zdravlje korisnika.

Ključne riječi: kontaminacija površina, predmeti opće uporabe, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, koliformne bakterije

Rad sadrži: 43 stranica
26 slika
0 tablica
0 priloga
33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. prof. dr. sc. Drago Šubarić – predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Hrvoje Pavlović – mentor
3. doc. dr. sc. Lidija Lenart – član
4. doc. dr. sc. Đurđica Ačkar – zamjena člana

Datum obrane: 17. listopada 2014. godine

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

graduate thesis

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Microbiology
Subdepartment of Microbiology
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Food microbiology

Thesis subject was approved by the Council of the Faculty of Food Technology Osijek at its session no VII. held on 17th of May, 2013.

Mentor: Hrvoje Pavlović, PhD, assistant prof.

Technical assistance: Vedran Gradvol, MSc, assistant

Microbiological contamination of surfaces and objects of public usage
Nina Mezedi, 159/DI

Summary: In this work, microbial population of toilet seats, paper currency and computer keyboards was analysed. Counts of bacteria genera *Streptococcus/Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, coliforms, enterobacteria, aerobic mesophilic bacteria and moulds and yeast as well as presence of bacteria genus *Salmonella* and *Escherichia coli* species was determined. Total of 19 toilet seats, 7 computer keyboards and 12 paper currency was tested. Bacteria genus *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus* are present more frequently on toilet seats in women toilet. Aerobic mesophilic bacteria are present in almost three times higher cell population (127 vs 50 cells/cm²) on male toilet seats. Counts of coliforms, enterobacteria and moulds and yeasts on analysed surfaces is insignificant. On paper currency and keyboard surface prevailed enterococci following *Staphylococcus aureus*. *Salmonella*, as well as *Escherichia coli* are not detected on any surface analysed. Since no pathogenic bacteria were detected, all analysed surfaces are safe for public usage.

Key words: surface contamination, object of public usage, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, coliforms

Thesis contains: 43 pages
26 figures
0 table
0 supplements
33 citations

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Drago Šubarić, PhD, full prof. – chair
2. Hrvoje Pavlović, PhD, assoc. prof. – supervisor
3. Lidija Lenart, PhD, assist. prof. – member
4. Đurđica Ačkar, PhD, assist. prof. – stand in

Defense date: 17th of October 2014.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Mikrobiološka kontaminacija površina.....	4
2.1.1. Drvo.....	4
2.1.2. Metal.....	5
2.1.3. Plastika.....	5
2.1.4. Staklo.....	5
2.2. Izvori kontaminacije.....	6
2.2.1. Mikroorganizmi iz zraka.....	6
2.2.2. Mikroorganizmi porijeklom od ljudi.....	7
2.3. Značaj mikroorganizama u zdravstvu i prehrambenoj industriji.....	8
2.3.1. Izvori epidemija.....	9
2.4. svojstva mikrobnih skupina, značajnih za higijenu površina i predmeta opće uporabe.....	9
2.4.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	9
2.4.2. Svojstvo koliformnih bakterija.....	10
2.4.3. <i>Escherichia coli</i>	11
2.4.4. <i>Salmonella</i>	12
2.4.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.4.6. Rod <i>Streptococcus</i>	16
2.4.7. Rod <i>Enterococcus</i>	16
2.4.8. Aerobne, mezofilne bakterije.....	17
2.4.9. Plijesni i kvasci.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1. Zadatak.....	22
3.2. Materijal i metode.....	23
4. REZULTATI.....	25
4.1. Mikrobna populacija sjedala na WC školjkama.....	26
4.2. Mikrobna populacija na analiziranim novčanicama.....	29
4.3. Mikrobna populacija na analiziranim tipkovnicama.....	32
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČCI.....	38
7. LITERATURA.....	41

1. UVOD

Kontaminacija površina predstavlja prisutnost mikroorganizama ili nepoželjnih čestica biološke, kemijske ili fizičke prirode, na ili u površini tvari (npr. mikroskopskim šupljinama površine hrane), koje se u normalnim uvjetima tu ne nalaze. Mikrobiološki kontaminanti predstavljaju mikroorganizme iz atmosfere, vode, tla, te porijeklom od ljudi, životinja i kukaca.

U biološke opasnosti u hrani (mikroorganizmi) koje mogu ugroziti zdravlje ljudi ubrajamo prione, viruse, viroide, bakterije, gljive (kvasce i plijesni) i parazite. Najznačajniji mikroorganizmi koji se mogu prenijeti hranom i predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi su: *Salmonella* spp. (meso, mlijeko, jaja), *Campylobacter* spp. (meso, piletina), *Escherichia coli* (loša higijena i križna kontaminacija), *Listeria monocytogenes* (mlijeko, mliječni proizvodi, puretina, piletina, povrće), *Staphylococcus aureus* (hrana bogata bjelančevinama), *Bacillus cereus* (riža, meso, mlijeko), *Clostridium botulinum* (konzerve, sušeno meso). Ostali uzročnici bakterijskih infekcija i intoksikacija su: *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Shigella* spp., *Bacillus subtilis*, itd.

Cilj diplomskog rada je bio ispitati mikrobiološku kontaminaciju površina i predmeta opće uporabe. Analize su provedene uzimanjem briseva s različitih površina: računalnih tipkovnica, novčanica i sjedala za WC školjku.

U radu bile su istražene slijedeće skupine mikroorganizama:

- Enterobakterije,
- koliformne bakterije,
- *Escherichia coli*,
- *Salmonella* spp.,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus* spp.,
- aerobne, mezofilne bakterije i
- plijesni i kvasci.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikrobiološka kontaminacija površina

Prema Pravilniku o učestalosti kontrole i normativima mikrobiološke čistoće u objektima pod sanitarnim nadzorom (MZSS, 2009.), površine pogona, opreme, uređaja, pribora i ruku osoba koji prilikom rada dolaze u dodir s hranom i predmetima opće uporabe moraju odgovarati normativima mikrobiološke čistoće. Normativom mikrobiološke čistoće propisuje se granica prihvatljivosti uzoraka obzirom na prisutnost, vrstu i broj mikroorganizama. Metodom određivanja mikrobiološke čistoće podrazumijevaju se postupci uzimanja uzoraka briseva za određivanje broja i vrste mikroorganizama na površinama. Metode se provode u skladu s međunarodnom normom ISO 18593 ili odgovarajućom hrvatskom normom kao referentnom metodom.

U prehrambenoj industriji, ali i svuda oko nas, upotrebljavaju se različiti tipovi radnih površina poput drveta, nehrđajućeg čelika, plastike ili stakla. Ove površine izložene su kontaminacijom mikroorganizmima odgovornih za križnu kontaminaciju hrane koja s njima dolazi u kontakt (Jay i Loessner, 2005.). Kako bi preživjeli nepovoljne uvjete okoline, poput topline i kemikalija, mikroorganizmi rastu u mikrokolonijama te posjeduju tendenciju stvaranja zaštitnog ekstracelularnog matriksa koji, uglavnom, sadrži polisaharide i glukoproteine, a zove se biofilm (Lelieveld i Mostert, 2005.). Stvaranje mikrokolonija je prvi stadij nastanka biofilma koji se zbiva kada postoje povoljni uvjeti na površini (dostupnost vode ili vlage su nužni za njihovo formiranje). Biofilmovi su izgrađeni od bakterija, plijesni i/ili protozoa koji samostalno ili u kombinaciji tvore mostove koji čvrsto prijanjaju za površinu (Jay i Loessner, 2005.). Radi očuvanja zdravlja, izuzetno je važno, na vrijeme, otkriti i ukloniti mikrobnu populaciju s čvrstih površina, posebno onih koji se koriste u obradi hrane, ali i onih izloženih većem broju ljudi (npr. kvake na vratima) (Burton, 1992.).

Različite površine posjeduju i različita svojstva, stoga je mikrobna populacija raznolika.

2.1.1. Drvo

Većina drvenih površina su vrlo porozne. Tijekom obrade sokovi iz prehrambenih proizvoda penetriraju s površine u unutrašnjost pora gdje ostaju zarobljeni, što predstavlja opasnost od križne kontaminacije. Iako neke bakterije uspijevaju opstati i nakon pranja i čišćenja, drvo sadrži prirodne spjeve koje uništavaju zaostale stanice. Zaštitom površine drveta lakovima sprječava se rast mikroorganizama kojima je, za rast i razmnožavanje, nužna voda (min. 15%). Različiti proizvodi od drva štite se od naseljavanja mikroorganizama impregniranjem pomoću antimikrobnih agenasa

(Duraković, 1996.). Ipak, *Campylobacter jejuni* dobro preživljava na drvenim površinama jer pore drveta štite stanice od kisika (Leliveld i Mostert, 2005.). Neke bakterije, kao *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* koje dospijevaju u pore drveta, ugibaju u kratkom vremenskom roku (3 do 10 minuta) (Sternhart i Doyle, 1995.).

2.1.2. Metal

Za razliku od drveta, u metala je česta pojava korozije; rezultat je različitih kemijskih reakcija što se temelje na elektrokemijskim pojavama. U procesima korozije osobito je važan rast bakterije *Desulfovibrio desulfuricans*. Sulfitoreduksijske bakterije metal ne napadaju izravno, ali ubrzavaju proces elektrolitičke korozije (Duraković, 1996). U prehrambenoj industriji najčešće se koriste površine od nehrđajućeg čelika. Međutim, i one su izložene rastu patogenih organizama u obliku biofilma kao npr.: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Leliveld i Mostert, 2005.). *Listeria monocytogenes* i *Flavobacterium* spp. zajedno tvore biofilm, te je prijanjanje *L. monocytogenes* još i više pojačano i ova bakterija bolje opstaje kada se nalazi u mješovitoj kulturi nego kada raste sama (Jay i Loessner, 2005.). *Bacillus cereus* stvara veoma otporne biofilmove na nehrđajućem čeliku koji predstavljaju veliki problem prehrambenoj industriji (Leliveld i Mostert, 2005.).

2.1.3. Plastika

U usporedbi s drvenim površinama, plastične mase ne posjeduju poroznu površinu, te sokovi iz mesa, prljavština kao i bakterije na njima s različitih namirnica ne penetriraju u unutrašnjost, već se pranjem uklanjaju. Tijekom procesa obrade namirnice (sječenje, rezanje) noževima se ne bi smjeli praviti veliki zarezi, koji bi poslužili kao mjesto razmnožavanja mikroorganizama. Na plastičnim površinama *Salmonella* iznimno dobro raste u obliku biofilma. Bakterija *Pseudomonas fluorescens*, kada raste sa salmonelom, tvori otporan sloj koji se vrlo teško uklanja, čak i s kemijskim sredstvima tijekom postupaka čišćenja. Na plastičnim površinama pronađena je i *Listeria monocytogenes* (Leliveld i Mostert, 2005.).

2.1.4. Staklo

Iako se staklo smatra jednom od, mikrobiološki, vrlo sigurnih površina, i na njemu se mogu pronaći biofilmovi. Eksperimentalni rad sa sojevima *Listeria monocytogenes* (u laboratorijskim uvjetima) ukazuje na pričvršćivanje stanica već nakon 3 sata inkubacije, a nakon 24 sata svi sojevi su oblikovali

čvrst biofilm. Dokazano je kako staklene površine mogu sudjelovati u križnoj kontaminaciji hrane s *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* (Leliveld i Mostert, 2005.).

2.2. Izvori kontaminacije

Radne površine u proizvodnji hrane, ali i predmeta opće uporabe, se mogu kontaminirati:

- mikroorganizmima,
- kemijskim spojevima i
- fizičkim materijalima.

Prehrambeni proizvodi se mogu kontaminirati tijekom rasta, žetve, transporta, skladištenja te procesa prerade u gotov proizvod. Gotov proizvod se može rekontaminirati tijekom skladištenja, transporta do mjesta prodaje, te tijekom skladištenja i pripreme kod potrošača. Najveći izvori kontaminacije su okoliš, životinje te ljudi. Glavni put prijenosa kontaminacije je prijeko kontaminiranih površina, atmosfere, vode, tla, štetnika i ljudi. Pakiranje hrane i transport vozilima također je od velikog značaja u sprječavanju/širenju kontaminacije (Leliveld i Mostert, 2005.).

2.2.1. Mikroorganizmi iz zraka

Atmosfera je neprijateljski okoliš za mikroorganizme, prvenstveno služi kao okoliš kojim se mikroorganizmi rasprostiru. Kao prebivalište, karakterizirano je visokim svjetlosnim intenzitetom, velikim temperaturnim razlikama (od -18 do +49 °C), niskom koncentracijom organske tvari i malom relativnom vlažnosti (Leliveld i Mostert, 2005.). Usprkos tome, u atmosferi se nalazi znatan broj mikroorganizama. U zraku se nalaze vegetativne stanice i spore bakterija, gljiva, algi, čestice virusa i protozoa. Ovi mikroorganizmi predstavljaju populaciju koja dospijeva s kopnenih i vodenih površina, životinja te od ljudi (kihanje, kašljanje, smijanje, ali i presvlačenje, češljanje kose...). Prijenos mikroorganizama zrakom je veoma lagan i moguć čak i na velike udaljenosti (Duraković, 1996.).

Spore *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., te gram-pozitivnih bakterija (*Micrococcus* spp., *Sarcina* spp.) prevladavaju u atmosferi. Od gljiva, u zraku se najčešće nalaze *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. i *Penicillium* spp. (Ray, 2004.).

2.2.2. Mikroorganizmi porijeklom od ljudi**Mikroorganizmi s kože**

Zdrava koža predstavlja teško prodornu barijeru k unutrašnjim tkivima. Međutim, vrlo velik broj mikroorganizama preživljava na i u epidermalnim slojevima, u porama, folikulama vlasi dlake i kose. Njihov rast kontroliran je prisutnom vlagom, pH vrijednosti kože, temperaturom, znojem, kemijskim spojevima poput ureje i masnih kiselina, te prisutnošću drugih mikroorganizama koji izlučuju antimikrobne spojeve (Burton, 1992.). Većina mikroorganizama koji naseljavaju kožu su bezopasni, međutim nekoliko rodova aeroba i anaeroba mogu uzrokovati infekcije tako što svojom prisutnošću narušavaju prirodnu mikrobnu ravnotežu kože (Talaro i Talaro, 1996.). Bakterije koje naseljavaju kožu su: *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp.

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus* spp., i *Streptococcus* spp. su fakultativni anaerobi koji mogu prodrijeti dublje u kožu i uzrokovati lokalne ili sistemske infekcije. Bolesti koje se prijenose putem kože su: stafilokokne i streptokokne infekcije, male boginje, gnojni ekcemi, ekcem, čir, bradavice, sifilis. Mnogi sojevi navedenih bakterija proizvode enzime i opasne egzotoksine koji su uzročnici opasnih bolesti, poput toksičnog šoka kog uzrokuje *S. aureus*. Česte su i gljivične upale kože uzrokovane gljivama *Candida* spp. i *Sporothrix* spp. (Burton, 1992.).

Mikroorganizmi iz dišnog sustava

Tipični predstavnici mikroflore koji se nalaze na sluznici nosa i grla te donjeg dišnog sustava uključuju bakterijske vrste rodova: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Branhamella*, *Fusobacterium* i *Actinomyces*. Mnogi od ovih mikroorganizama mogu uzrokovati bolesti dišnog sustava poput prehlade, gripe, upale pluća, tuberkuloze (Burton, 1992.).

Mikroorganizmi iz probavnog sustava

Probavni sustav izgrađen je u obliku od velike cijevi s proširenim zonama za probavu hrane, apsorpciju nutrijenata te eliminaciju otpadnih produkata probave. Obzirom na njegovu veličinu, različita je i mikrobna populacija, u ovisnosti od zona probave hrane (Burton, 1992.).

U ustima najprisutniji su aerobi iz roda *Streptococcus* spp. (*S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. mitis*) (Talaro i Talaro, 1996.). Puno veći broj mikroorganizama se nalazi u crijevima. U crijevnom sadržaju dostupnost nutrijenata i vlage, pri konstantnoj temperaturi od 37 °C, omogućuje mnogim

fakultativnim i obligatnim anaerobima uspješno preživljavanje i umnožavanje. Većina ovih mikroorganizama su anaerobi vrsta *Bacteroides* i *Fusobacterium*, *Bifidobacterium* s manjom zastupljenosti *Clostridium* vrsta (Talaro i Talaro, 1996.). U skupinu fakultativno anaerobnih bakterija pripadaju koliformi ili indikatori fekalne kontaminacije. U skupinu spomenutih enterobakterija nalaze se *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus* i *Klebsiella* vrste. U fekalnim tvarima nalaze se također i virusi, većinom bezopasni, međutim, pod određenim uvjetima mogu uzrokovati gastroenteritis (Burton, 1992.). Zbog velikog broja mikroorganizama prisutnih u fecesu, fekalna kontaminacija predstavlja velik problem u prehrambenoj industriji, ali i mikrobiološkoj ispravnosti predmeta opće uporabe, budući vrlo mala količina fekalnog materijala unosi izrazito velik broj mikroorganizama. Problem je tim i veći što se u fecesu mogu nalaziti i patogeni mikroorganizmi.

2.3. Značaj mikroorganizama u zdravstvu i prehrambenoj industriji

Čiste kulture mikroorganizama se upotrebljavaju za proizvodnju antibiotika, probiotika, vitamina, enzima, proteina (Jay i Loessner, 2005.). Antibiotike proizvode bakterije *Lactococcus lactis*, plijesni: *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* te aktinomicete *Streptomyces griseus*. Mliječni napitci fermentirani probiotičkim bakterijama se proizvode, najčešće, uz pomoć bakterija mliječne kiseline: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. brevis* i *Bifidobacterium* spp. (Duraković, 1996). Proizvodnja vitamina B1, B2, B3 se provodi uz pomoć kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Trichosporon fermentans*. Proteini se proizvode pomoću kvasaca, bakterija, algi te jestivih (mesnatih) gljiva. Uporaba čistih kultura u prehrambenoj industriji je širokog spektra. Kvasci, plijesni i bakterije provode fermentaciju, koja predstavlja jedan od najvažnijih i najstarijih tehnoloških postupaka konzerviranja, te u proizvodnji fermentirane hrane i pića. U mliječnoj industriji koriste se za proizvodnju mliječnih napitaka i prerađevina: proizvodnja jogurta (*Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus bulgaricus*), acidofila (*Lactobacillus acidophilus*), kefira (*Torula kefiri*, *Lactobacillus bulgaricus*), sireva (*Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp., plijesni: *Penicillium roqueforti*, *P. camemberti*), maslaca (*Lactococcus lactis*, *L. diacetylactis*). Konzerviranje povrća (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*), proizvodnja fermentiranih mesnih proizvoda (*Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus* spp.) (Jay, 2000.). Proizvodnja vina, piva, alkoholnih pića i voćnih sokova također zahtijevaju uporabu mikrobioloških kultura.

2.3.1. Izvori epidemija

Epidemijom se definira više nego normalan, uobičajen broj uzročnika bolesti u nekoj oblasti ili teritoriju, unutar određenog vremenskog perioda. Infekcije koje su često endemične mogu postati epidemične. Čimbenici koji utječu na endemičku bolest su: odlaganje patogena, okruženje, genetička osjetljivost populacije, imunološki status populacije, zaraznost patogena (Reimann i Cliver, 2006.).

Bolesti uzrokovane mikroorganizmima se mogu prenijeti s osobe na osobu preko pet glavnih načina prenošenja:

- neposredno s osobe na osobu kontaktom preko kože kliconoše,
- neposredno preko pljuvačke, sluzi putem poljupca ili seksualnog odnosa,
- posredno preko kapljica ili onečišćenja u zraku,
- posredno kontaminacijom hrane ili vode fekalnim tvarima, preko životinja, tla ili drugih izvora i
- posredno kontaminacijom putem krvi, preko kukaca ili drugih životinja i neposredno preko injekcija s nesterilnom špricom ili iglom, kao i intravenoznom transfuzijom ili dijalizom bubrega (Burton, 1992.).

Većina bolesti, koja se prenosi neposrednim kontaktom, su one u kojima zaražena osoba prenosi patogene preko kože, najčešće preko ruku i lica. Mnogi virusi i oportunističke bakterije koje se prenose uzrokuju prehlade, gripu, stafilokokne i streptokokne infekcije, upalu pluća, tuberkulozu, difteriju i dr. U bolnicama ovakav način prenošenja prevladava. Dizenterički organizmi: *Salmonella* i *Shigella* prenose se ostatcima fekalija preko ruku, usta ili hrane. Putem pljuvačke moguća je zaraza herpesom, infektivnom mononukleozom, AIDSom, tuberkulozom. Zaraze i bolesti koje se dobivaju putem krvi (transfuzijom ili ubodom igle) su: hepatitis B, citomegalovirusna infekcija, malarija, AIDS. Gastrointestinalni prijenos od fecesa prijeko ruku do usta može biti uzročnik sljedećim bolestima: gastroenteritis, hepatitis, salmoneloza, šigeloza, kolera i tifus (Burton, 1992.).

2.4. Svojstva mikrobnih skupina, značajnih za higijenu površina i predmeta opće uporabe

2.4.1. *Enterobacteriaceae*

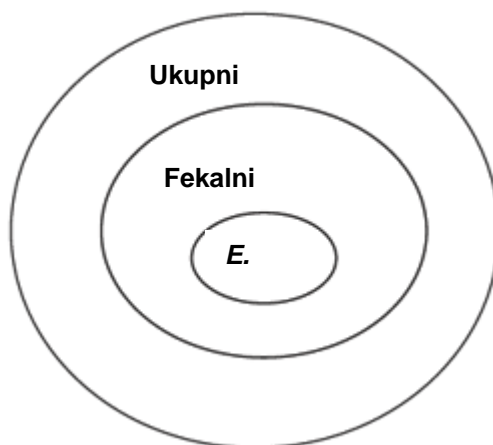
Obitelj *Enterobacteriaceae* ili crijevne (enteričke) bakterije predstavljaju skupinu bakterija koje se nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja. Neke su vrste stalni stanovnici, dok se druge nalaze samo u oboljelih organizama. Ove bakterije, djelomično, čine dio normalne, odnosno, fiziološke crijevne flore. Obuhvaćaju i patogene i uvjetno patogene bakterije. Neke vrste uzrokuju samo

crijevne bolesti, a neke i bolesti dišnog ili mokraćnog sustava (Weisglass, 1989.). *Enterobacteriaceae* je skupina fakultativno anaerobnih, mezofilnih, gram-negativnih, asporogenih štapićastih bakterija koje fermentiraju glukozu do kiseline i plina. Ukupno je poznato 28 rodova, a među važnim rodovima enterobakterija nalaze se *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Erwinia* i *Enterobacter* (Duraković, 1996.).

2.4.2. Svojstvo koliformnih bakterija

Koliformne bakterije se uobičajeno koriste kao bakterijski indikatori higijenske kvalitete hrane, vode i različitih površina. Primarno su apatogene i normalno obitavaju u donjem probavnom sustavu (debeli crijevo) čovjeka i životinja, gdje su odgovorne za pravilnu probavu hrane; iz organizma se izlučuju fekalijama. Uglavnom su uvjetni (oportunistički) patogeni, što znači da će se infekcija pojaviti u slučaju oslabljenog imuniteta (zbog postojeće neke druge bolesti ili predispozicije za bolest) te tako mogu uzrokovati različite infekcije. Prisutnost koliformnih bakterija ukazuje na moguću prisutnost patogenih organizama: bakterija, virusa, protozoa ili parazita fekalnog porijekla. Koliformne bakterije su fakultativno anaerobni gram-negativni štapići, ne tvore spore, mogu fermentirati laktozu proizvodeći kiseline i plin inkubirane na 35 - 37 °C za 48 sati. Izvor su fekalije, zemljište i voda. Uključuju četiri roda iz porodice *Enterobacteriaceae*: rod *Escherichia*, rod *Enterobacter*, rod *Citrobacter* i rod *Klebsiella* (Ray, 2004.).

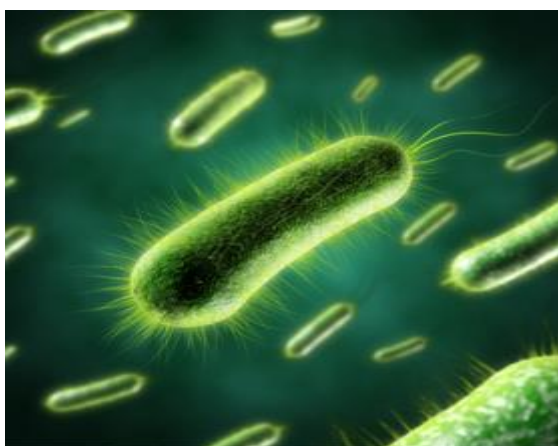
Ukupni koliformi obuhvaćaju rodove: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* i fekalne koliforme. Fekalni koliformi predstavljaju dio ukupnih koliforma i obuhvaćaju rodove: *Escherichia*, *Klebsiella* i *Enterobacter* (Ray, 2004.). Izvor su, kako im i ime govori, fekalije. 60% od 90% ukupnih koliforma su fekalni koliformi, dok je 90% od fekalnih koliforma *E. coli*. *Escherichia coli* je glavni predstavnik fekalnih koliforma, te se ona uzima kao indikator organizam za druge patogene koji mogu biti prisutni u fecesu.



Slika 1 Klasifikacija koliforma (<http://www.scielo.org.za>, 2009.).

2.4.3. *Escherichia coli*

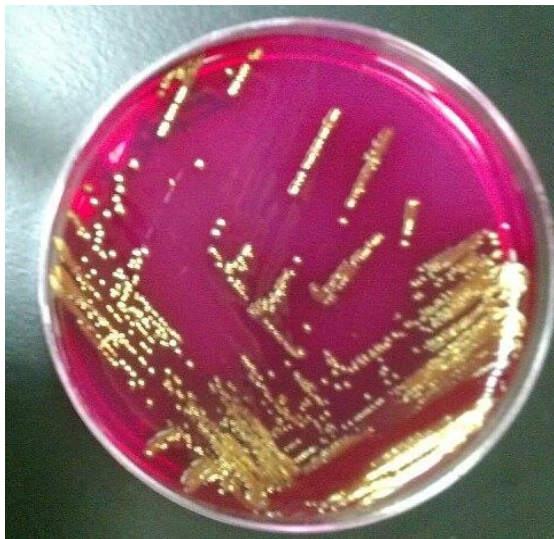
E. coli obuhvaća gram-negativne, asporogene bakterije veličine 1 do 3 × 0,4 do 0,7 µm. Većinom su pokretne, okružene bičevima. Veliki postotak sojeva posjeduje i fimbrije, dok neki sojevi posjeduju kapsulu.



Slika 2 *Escherichia coli* (<http://lifescience.biomedal.com>, 2013.).

Fakultativni je anaerob. *E. coli* ugiba na temperaturi od 60 °C za 15 minuta, dok niske temperature dobro podnosi. Stanište *E. coli* je probavni sustav čovjeka i životinja gdje se nalazi kao komenzal ili kao saprofit. Unutar normalne flore debelog crijeva *E. coli* nalazi se približno u koncentraciji 10⁸ stanica/gramu fecesa (Weisglass, 1989.). Većina sojeva *E. coli* su bezopasni stanovnici probavnog trakta, samo mali postotak smatra se patogenim. Postoji šest skupina patogenih sojeva, od kojih je poznato kako enterotoksična (ETEC), enteropatogena (EPEC) i enterohemoragična (EHEC) uzrokuju teške bolesti. Može se smatrati potencijalnim uzročnikom bolesti svakog organa, a najviše

urogenitalnog trakta (infekcije mokraćnih puteva limfogenim ili hematogenim putem), postoji mogućnost ascendentalnog širenja od uretre prema mokraćnom mjehuru i bubrezima. Može biti uzročnik dijareje, nerijetko septikemije, upale pluća i meningitisa (Bhunja, 2008.).



Slika 3 *Escherichia coli* na Endo agaru (<http://www.microbeworld.org>, 2014.).

2.4.4. *Salmonella*

Salmonele su dio obitelji *Enterobacteriaceae*. Gram-negativni su, asporogeni štapići, pokretni osim *S. gallinarum* i *S. pullorum*. Kreću se peritrihalnim flagelama, dok neki sojevi posjeduju i fimbrije. Duljine su od 2 do 3 μm i širine 0,6 μm . Fakultativni su anaerobi. Ne tvore kapsulu. Mogu rasti u temperaturnom rasponu od 7 do 45 °C, s optimalnom temperaturom rasta od 35 do 37 °C. *Salmonella* tvori velike filamentozne lance kad raste pri temperaturnim ekstremima od 4 do 8 °C ili iznad 44 °C (Weisglass, 1989.).



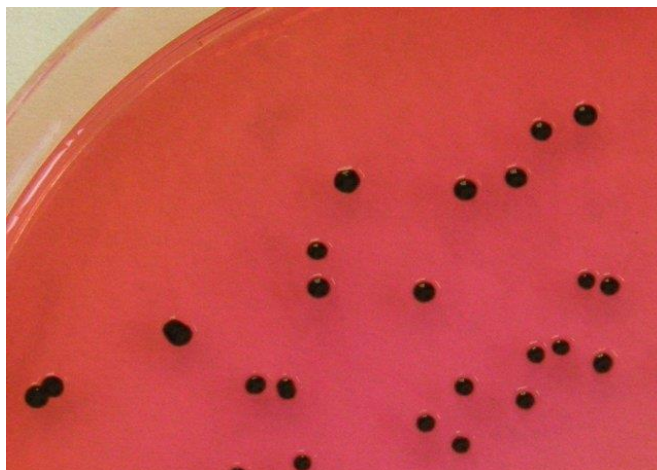
Slika 4 *Salmonella enterica* (<http://www.infectionlandscapes.org>, 2013.).

Salmonella su prisutne u probavnom traktu ptica, životinja i ljudi, te u otpadnim vodama što rezultira velikom raznolikošću izvora infekcija izazvanih salmonelom (Bhunja, 2008.). Ljudske salmoneloze se uobičajeno prenose hranom animalnog porijekla poput mesa, jaja, mlijeka, mliječnih proizvoda (sirevi, sladoled), mada ih ima na voću i povrću, gdje dospijevaju uporabom fecesa stoke (koji sadrže ove bakterije) kao gnojiva. Ipak, perad i jaja predstavljaju najveći izvor hranom prenosivih salmoneloza.

S. enteritidis i *S. typhimurium* su klasificirani kao dva najveća etiološka uzročnika salmoneloza koje su se prilagodile ljudima. *S. enteritidis* se najviše nalazi u jajima i peradi, dok je *S. typhimurium* najčešće prisutna na mesu peradi, svinja i ovaca (Carraso i sur., 2011.).

Salmonele dospijevaju u ljudski organizam oralnim putem. Praktično su sve bakterije roda *Salmonella* patogene za čovjeka, i izazivaju različite bolesti (salmoneloze), koje se mogu grupirati na slijedeći način:

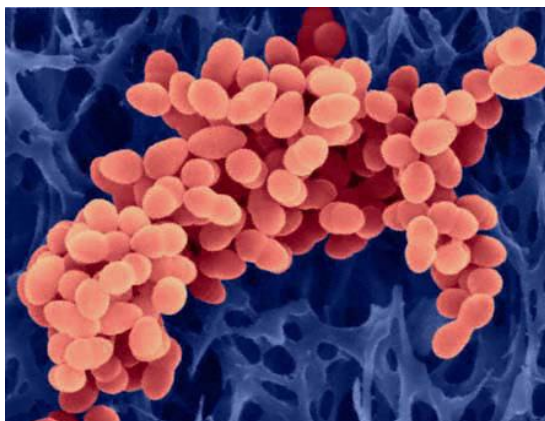
- Enteralne groznice: zarazne bolesti u kojima je najznačajniji crijevni tifus (*S. typhi*); u žučnom mjehuru ili u jetri izazivaju upale i žarišne nekroze. Dolazi i do upale pluća, srca i do niza različitih kliničkih stanja (npr. stalne visoke tjelesne temperature od 40 °C),
- Gastroenteritis: nastaje obično nakon trovanja hranom. Veće količine toksina unesenih kontaminiranom hranom jako iritiraju sluznicu crijeva što dovodi do učestalih proljeva (vodnjikav, zelenkast feces sa sluzi), pojavom krvi, dehidracijom i blagom groznicom. Uzročnik može biti *S. typhimurium* i
- Septikemije: nakon oralne infekcije bakterije rano prodiru u krv tako da crijeva često nisu niti zahvaćena. Putem krvi šire se po čitavom organizmu. U pojedinim organima stvaraju žarišne infekcije, čireve i tvore gnojne upale (Weisglass, 1989.).



Slika 5 *Salmonella* spp. na XLD agaru (<http://cit.vfu.cz>, 2011.).

2.4.5. *Staphylococcus aureus*

Rod *Staphylococcus* (obuhvaća 19 vrsta) pripada porodici *Micrococcaceae* (Weisglass, 1989.). *S. aureus* je najvažnija stafilokokna vrsta, lako prepoznatljiva prema njegovim zlatnožuto obojenim kolonijama (aureus znači zlatan) (Duraković, 1996.). Gram-pozitivna je bakterija, okruglog oblika, nepokretna, asporogena. Dije se u više ravnina, pa se stanice nalaze u grupama ili grozdovima. Neki sojevi su inkapsulirani, a neki posjeduju i sluzavi ovoj (Miliotis i Bier, 2003.). Okrugao oblik, kombiniran s gram-pozitivnom staničnom stjenkom, omogućuje im preživljavanje i rast u okolišu s visokim osmotskim tlakom (Duraković, 1996.). Veličina im varira, ovisno od vrste ili soja, starosti kulture ili vrste podloge od 0,8 do 1 μm . *Staphylococcus aureus* je fakultativni anaerob, ali najbolje raste u aerobnim uvjetima. Rastu pri temperaturnom rasponu od 7 do 47,8 °C, optimalna temperatura je 35 °C, te pri pH 4,5 – 9,3. Kontaminanti su slatkih i slanih namirnica jer podnose 15% NaCl. Stafilokoke nalazimo u zraku, prašini, otpadnim vodama, vodama, hrani, mlijeku, na ljudima, životinjama te raznim radnim površinama (Miliotis i Bier, 2003.). Kod ljudi naseljavaju kožu, mukozne površine gornjeg respiratornog sustava, tvore čireve. U probavni sustav dospijevaju putem kontaminirane hrane. Umnožavaju se u crijevima (Weisglass, 1989.).



Slika 6 *Staphylococcus aureus* (<http://www.musee-afrappier.qc.ca>, 2008.).

S. aureus luči čitav niz raznih celularnih i ekstracelularnih spojeva. Većina ekstracelularnih spojeva je toksična, što pridonosi patogenosti ove bakterije. U najznačajnije ekstracelularne toksine spadaju:

- Enterotoksin: termostabilan je i prema temperaturama od 100 °C. Jedan enterotoksičan soj *S. aureus* može izlučivati više različitih enterotoksina. Enterotoksine se stvaraju u hrani bogatoj ugljikohidratima (sladoled, kolači). Enterotoksikogeni sojevi *S. aureus* kod ljudi izazivaju alimentarne toksikoinfekcije. Do bolesti dolazi konzumiranjem kontaminirane hrane. Bolest je praćena povraćanjem, mučninom i dijarejom i
- Epidermolitički toksin: Kod stafilokoknih infekcija djece te novorođenčadi izaziva toksičnu nekrolizu površinskih slojeva kože. Zbog utjecaja toksina, na koži se stvaraju mjehuri, nakon čega se koža počinje ljuštiti i izgleda kao opečena.

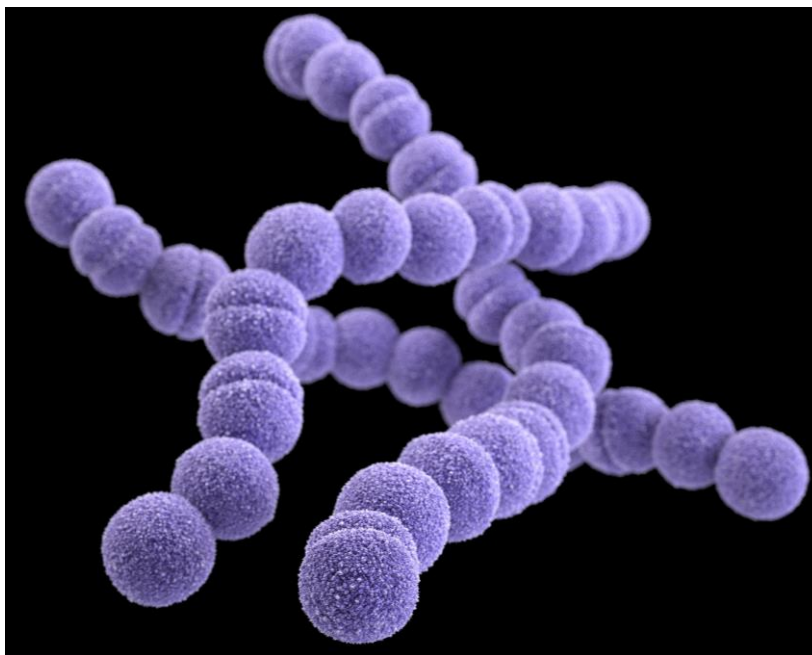
S. aureus uzrokuje niz drugih kliničkih bolesti zvanih stafilokokoze (zarazne bolesti) poput: stafilokoknog akutnog enteritisa, stafilokokne upale pluća, oštećenja na površini kože, artritis, ponekad i meningitis, te infekcije sluznice nosa, grla i sinusa (Burton, 1992.).



Slika 7 Infekcija kože izazvana *S. aureus* (<http://www.dermweb.com>, 2013.).

2.4.6. Rod *Streptococcus*

Bakterije roda *Streptococcus* su gram-pozitivne, nepokretne, asporogene, fakultativno anaerobne do striktno anaerobne. Okruglog su oblika, veličine 0,5 – 2 μm . Stanice su međusobno povezane u parove ili lance različitih duljina. Rastu pri temperaturama od 25 do 45 °C, dok im je optimalna temperatura rasta 37 °C.



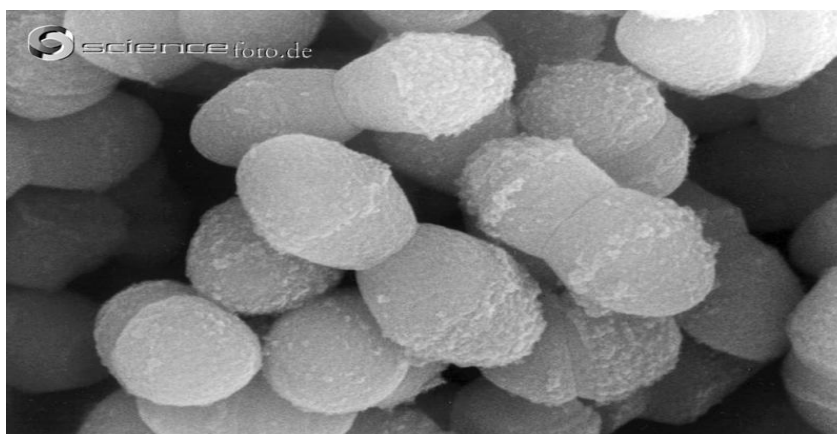
Slika 8 *Streptococcus pyogenes* (<http://www.cdc.gov>, 2014.).

Stanište im je u fecesu ljudi i životinja, na koži, sluzokoži, mikroflori genitalnog i respiratornog trakta, vodi, zemljištu, mlijeku i mliječnim proizvodima, mesu i proizvodima od mesa, smrznutim namirnicama (Reimann i Cliver, 2006.). Patogeni streptokoki sintetiziraju veliki broj ekstracelularnih tvari koje pridonose razvoju bolesti. Među njima su spojevi koji razaraju fagocitičke stanice, koje su neophodne za obranu organizma (Duraković, 1996.). *S. pyogenes* i *S. pneumoniae* smatraju se primarnim patogenima. Patogeni streptokoki sudjeluju u gnojnim procesima, izazivaju bolesti poput šarlaha, septičke angine, akutne reumatske groznice te alimentarnih toksikoinfekcija (Weisglass, 1989.).

2.4.7. Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* je novoimenovan rod za fekalne *Streptococcus* vrste: *Streptococcus faecalis* i *S. faecium* koje su sad poznate kao *Enterococcus faecalis* i *E. faecium*. Bakterije roda *Enterococcus* su gram-pozitivni, nepokretni, fakultativno anaerobni mikroorganizmi, saprofiti koji, pod određenim

uvjetima, mogu postati patogeni. Stanice su veličine $0,6 - 2,0 \times 0,6 - 2,5 \mu\text{m}$ okruglog ili elipsoidnog oblika i dolaze u parovima ili kratkim lancima. Optimalna temperatura za rast im je 37°C , ali mogu rasti u rasponu od 10 do 45°C . Stanište im je probavni trakt životinja, ptica te kukaca. Veliki broj enterokoka nalazi se na živežnim namirnicama, pogotovo u sirevima; njihova prisutnost u namirnicama ukazuje na neposrednu ili posrednu kontaminaciju fekalnim tvarima (Reimann i Cliver, 2006.). Kod ljudi enterokoki mogu uzrokovati infekcije mokraćnog sustava, ponekad bakterijskog endokarditisa i sepsu (Weisglass, 1989.). Enterokoki, kao skupina, su dobri indikatori kontaminacije vode patogenim mikroorganizmima, u zajednici s fekalnim koliformima (Reimann i Cliver, 2006.).



Slika 9 *Enterococcus faecalis* (<http://www.sciencefoto.de>, 2014.).

2.4.8. Aerobne, mezofilne bakterije

Obuhvaćaju široku skupinu bakterija koje rastu u temperaturnom rasponu od 20 do 45°C (mezofilno), uz prisustvo kisika (aerobno) ili kao fakultativni anaerobi koji ne koriste kisik, ali u njegovoj prisutnosti bolje rastu. Većini ovih bakterija je optimalna temperatura 37°C (čovjekova tjelesna temperatura), što znači kako skupini aerobnih, mezofilnih bakterija pripada većina patogenih bakterija (Duraković, 1996.). U aerobne, mezofilne bakterije ubrajamo rodove: *Pseudomonas*, *Legionella*, *Neisseria*, *Brucella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio* itd. (Weisglass, 1989.).

Povećan broj aerobnih, mezofilnih bakterija u hrani indikator je starosti i lošije mikrobiološke kakvoće (kontaminacije i/ili početka kvarenja). Kod mikrobioloških briseva broj aerobnih, mezofilnih bakterija predstavlja količinu bakterija koja se nalazi na površinama, rukama i priboru koja, ako je povećana, ukazuje na nedovoljno čišćenje, pranje i dezinfekciju (Talaro i Talaro, 1996.).



Slika 10 Izrasle kolonije na TGK podlozi (podloga za ukupan broj bakterija)

2.4.9. Plijesni i kvasci

Plijesni i kvasci spadaju u carstvo *Fungi* (gljiva). Ovi organizmi su eukarioti, posjeduju stanične stijenke, mogu biti jedno ili višestanični organizmi koji se hrane apsorpcijom hranjivim tvarima iz okoliša.

Plijesni

Plijesni su mikroskopske gljive koje se često nalaze u prirodi gdje uzrokuju razgradnju različitih materijala, ali se mogu koristiti i za proizvodnju hrane i antibiotika. Nitaste su građe, niti (hife) rastu kao isprepletana masa, koja se zajedničkim imenom naziva micelij. Žitarice, uljarice, kikiriki, voće i povrće predstavljaju dobre podloge za rast tijekom uzgoja, prerade i skladištenja. Razvoju plijesni pogoduje visoka vlaga i temperatura te oštećenje biljke na kojoj se razmnožavaju. Neki od najčešćih rodova plijesni su *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Eurotium* (Duraković, 1996.). Značaj plijesni: u prehrambenoj industriji primjenjuju se u proizvodnja sireva, u farmaceutskoj industriji te kao biopesticidi i stimulatori rasta biljaka. Međutim, plijesni su i uzročnici kvarenja, truljenja, raspadanja prehrambenih proizvoda, trovanja i uzročnici mikoza. Za rast i razvoj sintetiziraju primarne metabolite, dok kao obranu od drugih mikroorganizama proizvode i sekundarne metabolite (antibiotike i mikotoksine). Mikotoksini su visoko stabilni i teško

razgradljivi spojevi, posebno opasni zbog svoje visoke toksičnosti u malim količinama i odsutnosti bilo kakvog senzorskog upozorenja pri konzumaciji hrane koja je kontaminirana. Mikotoksini su mutageni, karcinogeni, hepatotoksični, neurotoksični, imunotoksični spojevi. Uzrokuju iritacije kože, bolesti bubrega, jetre ili kronične bolesti uključujući karcinom, oštećenja novorođenčadi i smrt. Najznačajnije toksikogene plijesni su: *Aspergillus* spp.- proizvode aflatoksine i okratoksin, *Penicillium* spp. - proizvode patulin i citrinin, *Fusarium* spp. - proizvode zearalenon i fumonizin (Bhunja, 2008).



Slika 11 *Aspergillus flavus* na kukuruzu (<http://www.forestryimages.org>, 2010.).

Kvasci

Kvasci su nemicelijske, jednostanične, eukariotske mikroskopske gljive jajolikog, okruglog, ili štapićastog oblika. Veličina kvasaca razlikuje se ovisno o vrsti i uvjetima rasta. Neki kvasci su duljine 2 do 3 μm , dok drugi mogu postići i duljinu između 20 i 50 μm te širinu između 1 i 10 μm . Najbolje rastu pri temperaturnom rasponu od 20 do 30 °C (Duraković, 1996.). Prirodno stanište su im površinska tkiva biljaka, listovi, cvjetovi, plodovi, međutim, rasprostranjeni su i na koži i u probavnom traktu preživača. Zbog svoje metaboličke različitosti izuzetno su značajni u mnogim industrijskim procesima, poput proizvodnje kruha, piva, alkoholnih pića, fermentiranih namirnica (meso, povrće). Najviše upotrebljavan kvasac je *Saccharomyces cerevisiae* (pekarski kvasac), ostali rodovi kvasaca su *Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Malassezia*, *Filobasidiela*, *Rhodotorula* itd. (Ray, 2004). *Candida albicans*, patogeni kvasac, uzročnik je mikoza. Kao oportunist bezopasno obitava na koži i mukoznim membranama usta, probavnog i genitalnog trakta. Kod poremećaja kemijske ravnoteže, kada je

smanjen broj normalnih bakterija, kvasci se umnožavaju i uzrokuju infekcije usta, kože i vagine. Tada lokalne infekcije postaju žarište s kojeg dolazi do prodora u krvotok, te nastaju sistavne infekcije koje napadaju unutrašnje organe (Burton, 1992.).



Slika 12 *Candida albicans* (<http://albicans-candida.blogspot.com>, 2008.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada je bio ispitati mikrobnu kontaminaciju površina i predmeta opće uporabe. Ispitana je površina sjedala za WC školjku, računalnih tipkovnica i papirnatih novčanica. Na svakoj analiziranoj površini i predmetnu istražena je sljedeća mikrobna populacija:

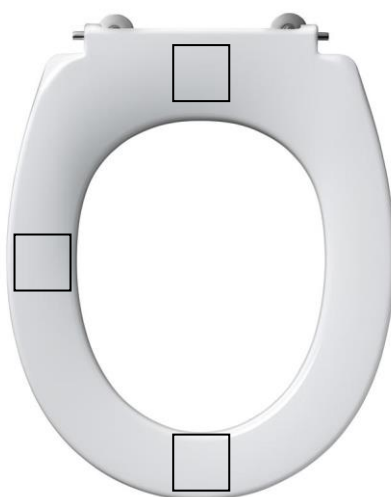
- Enterobakterije,
- koliformne bakterije,
- *Escherichia coli*,
- *Salmonella* spp.,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus* spp.,
- aerobne, mezofilne bakterije i
- plijesni i kvasci.

Ukupno je analizirano 19 uzoraka sjedala za WC školjku, 7 računalnih tipkovnica i 12 papirnatih novčanica.

3.2. MATERIJAL I METODE

Za istraživanje kontaminacije površina, uporijebljena je metoda brisa. Sterilan štapić za bris je ovlažen sterilnom fiziološkom otopinom (epruveta s 10 mL sterilne fiziološke otopine) te je pažljivim povlačenjem navlaženog dijela štapića (unutar sterilne metalne šablone površine 25 cm²) mikrobna populacija prenesena na sterilnu vatu kako bi se, potom, odredila mikrobiološkom analizom. Nakon povlačenja štapića u tri smjera po analiziranoj površini, štapić je unesen u epruvetu s 10 mL sterilne fiziološke otopine, slomljen o stijenku te je, potom, uzorak homogeniziran na Vibromixu tijekom 10 minuta.

Mikrobiološka površina sjedala za WC školjke određena je uzimanjem uzorka površine 25 cm² s tri mjesta (Slika 13.). Papirnatih novčanica su analizirane povlačenjem štapića po jednom, nasumično odabranom kvadratu površine 25 cm². Mikrobna populacija računalnih tipkovnica određena je povlačenjem štapića za bris po najčešće korištenim dijelovima – slovima A S D F J K L Č te sljedećim tipkama: RAZMAKNICA ENTER BACKSPACE.



Slika 13 Mjesta uzorkovanja mikrobne populacije sjedala za WC školjku.

Hranjive podloge

Za odabrane mikroorganizme korištene su sljedeće podloge:

- Enterobakterije i koliformne bakterije = ljubičasto-crveni žučni agar s laktozom (VRBL) i ljubičasto-crveni žučni agar s glukozom (VRBGA); Biolife, Italija. Podloga je nacijepljena prenošenjem 0,5 mL inokuluma u sterilnu zdjelicu. Ulivena je sterilna podloga (ohlađena na 48 °C), homogenizirana, i ostavljena do skrutnjavanja. Nakon toga, skrutnuta podloga je prelivena s tankim slojem iste podloge (tzv. sendič sloj) kako bi se osigurali fakultativno anaerobni uvjeti rasta i olakšalo prebrojavanje. VRBL je inkubiran na 44 °C, a VRBGA na 37 °C 24 sata. Nakon inkubacije, prebrojane su porasle kolonije crveno-ružičaste boje s ružičastom zonom precipitata i broj je preračunat na istraženu površinu.
- *Escherichia coli* = Endo agar (Biolife, Italija). Inokulum od 0,1 mL je prenesen na agarnu površinu i razmazan sterilnim staklenim štapićem po Drigalskom. Nakon inkubacije pri 37 °C nakon 24 sata, prebrojane su porasle crvene kolonije metalnog sjaja i broj bakterija vrste *E. coli* je preračunat na istraženu površinu.
- *Salmonella* spp. = ksiloza lizin dezoksikolatni agar (XLD; Biolife, Italija). Inokulum od 0,1 mL je prenesen na agarnu površinu i razmazan sterilnim staklenim štapićem po Drigalskom. Nakon 24 satne inkubacije pri 37 °C, prebrojane su crno obojene kolonije i njihov broj je preračunat na istraženu površinu.

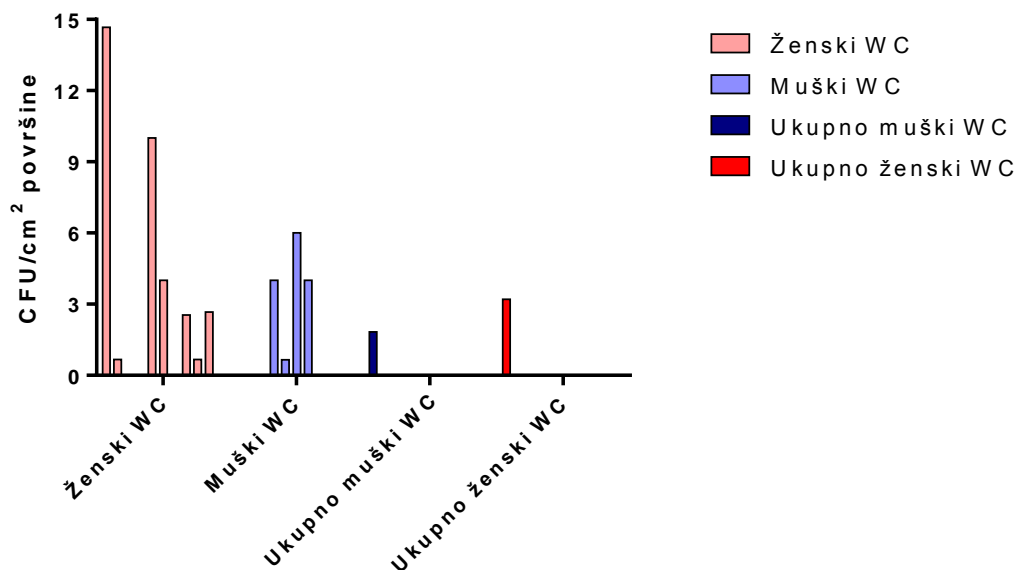
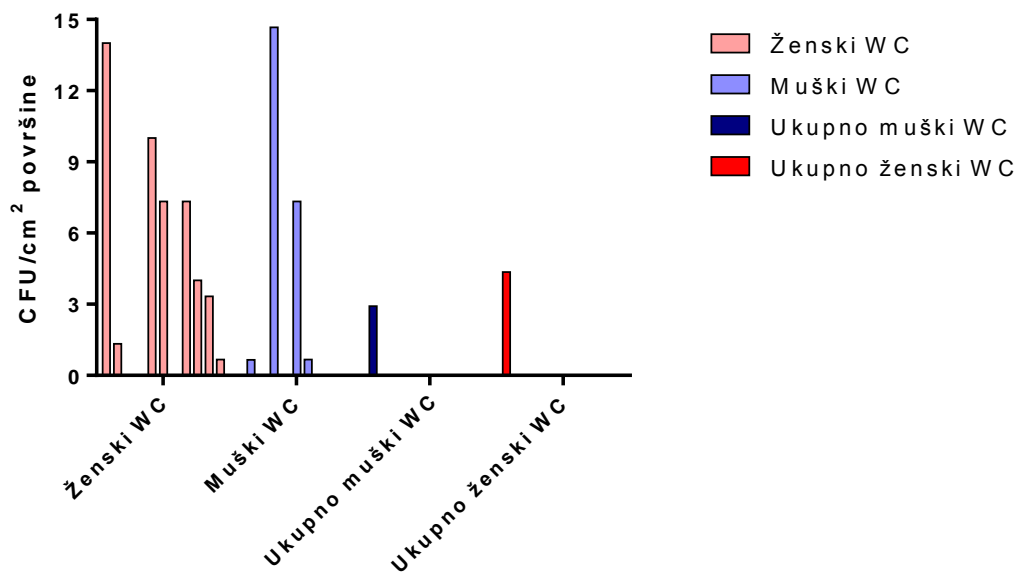
- *Staphylococcus aureus* = manitol slani agar (MSA; Biolife, Italija). Inokulum od 0,1 mL je prenesen na agarnu površinu i razmazan sterilnim staklenim štapićem po Drigalskom. Nakon inkubacije pri 37 °C poslije 24 sata, zlatno-žute kolonije sa zonom fermentiranog manitola su prebrojane i broj je preračunat na istraženu površinu.
- *Streptococcus* spp. = *Streptococcus* selektivni agar (Biolife, Italija).). Inokulum od 0,1 mL je prenesen na agarnu površinu i razmazan sterilnim staklenim štapićem po Drigalskom. Nakon 24 sata inkubacije pri 37 °C, bijelo obojene sitne kolonije su prebrojane i njihov broj preračunat na analiziranu površinu.
- Aerobne, mezofilne bakterije = Triptički agar s glukozom i ekstraktom kvasca (TGK agar; Biolife, Italija). Inokulum volumena 1 mL prenesen je u sterilnu praznu petrijevu zdjelicu te je uliven TGK agar (otopljen i ohlađen na 48 °C). Nakon homogenizacije i skrutnjavanja, zdjelicu su inkubirane 7 dana pri 28 °C te su prebrojane porasle kolonije i njihov broj je preračunat na analiziranu površinu.
- Plijesni i kvasci = krumpirov agar s glukozom (PDA agar; Biolife, Italija). Inokulum volumena 1 mL prenesen je u sterilnu praznu petrijevu zdjelicu te je uliven PDA agar (otopljen i ohlađen na 48 °C). Nakon homogenizacije i skrutnjavanja, zdjelicu su inkubirane 7 dana pri 25 °C te su prebrojane porasle kolonije plijesni i kvasaca i njihov broj je preračunat na analiziranu površinu.

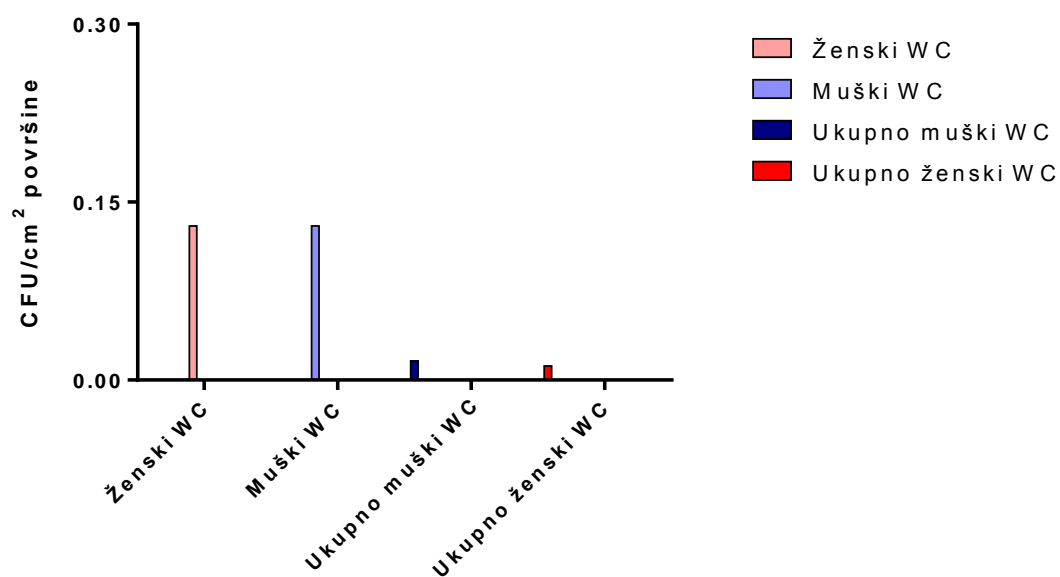
3.3. OBRADA PODATAKA

Rezultati određivanja mikrobne populacije analiziranih površina i predmeta opće uporabe obrađeni uz pomoć računalnih programa Microsoft® Office Excel 2003 za Windows (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i GraphPad Prism verzija 5.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, SAD).

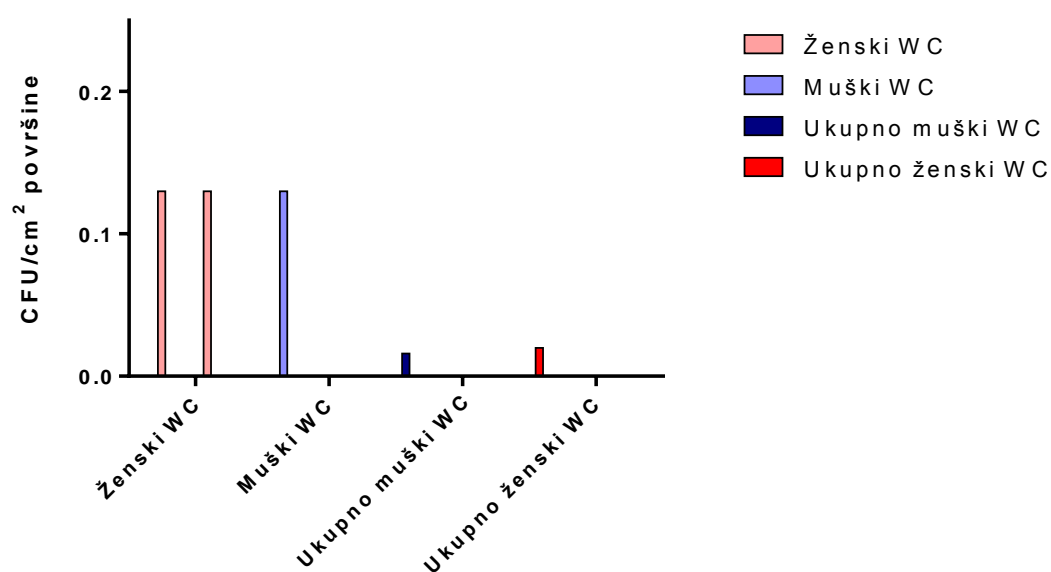
4. REZULTATI

4.1. MIKROBNA POPULACIJA SJEDALA NA WC ŠKOLJKAMA

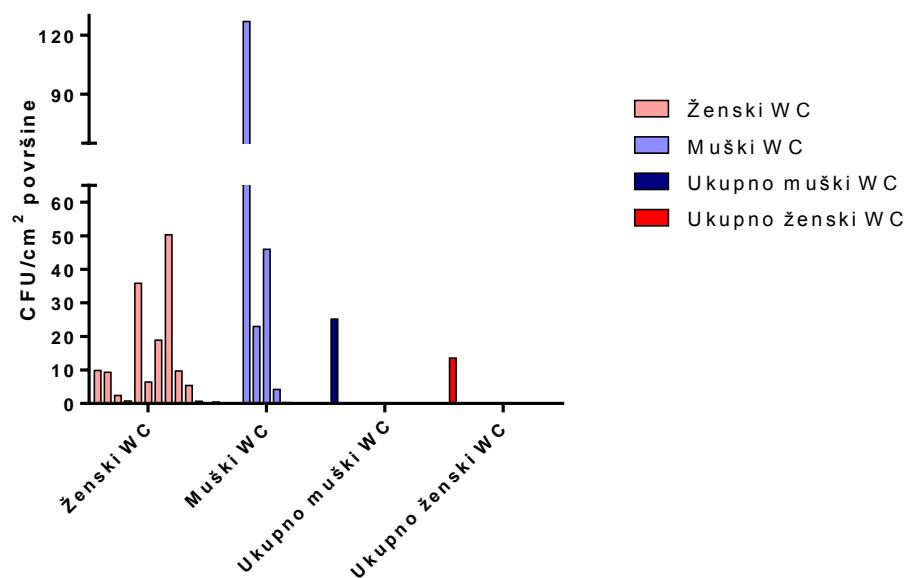
Slika 14 Broj bakterija roda *Enterococcus* na cm² ispitane površineSlika 15 Broj bakterija vrste *Staphylococcus aureus* na cm² ispitane površine



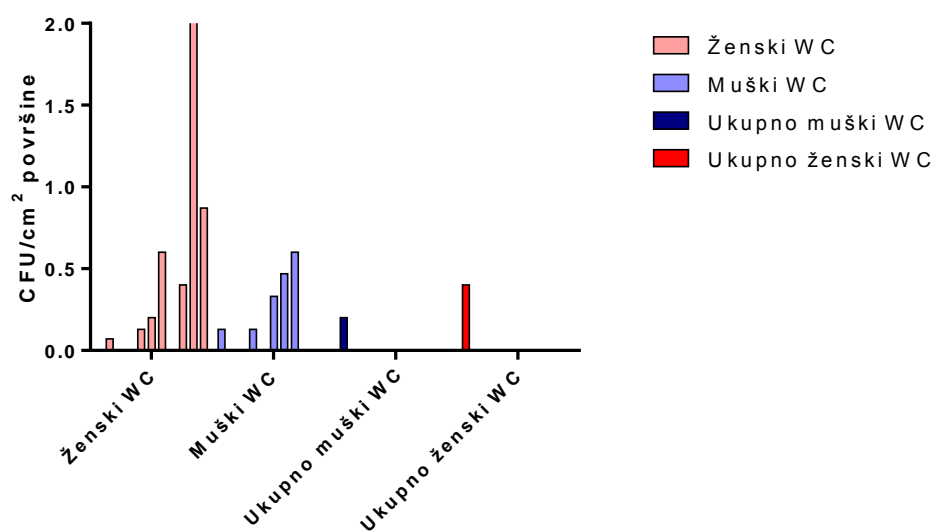
Slika 16 Broj enterobakterija na VRBG agaru na cm² ispitane površine



Slika 17 Broj koliformnih bakterija na VRBL agaru na cm² ispitane površine

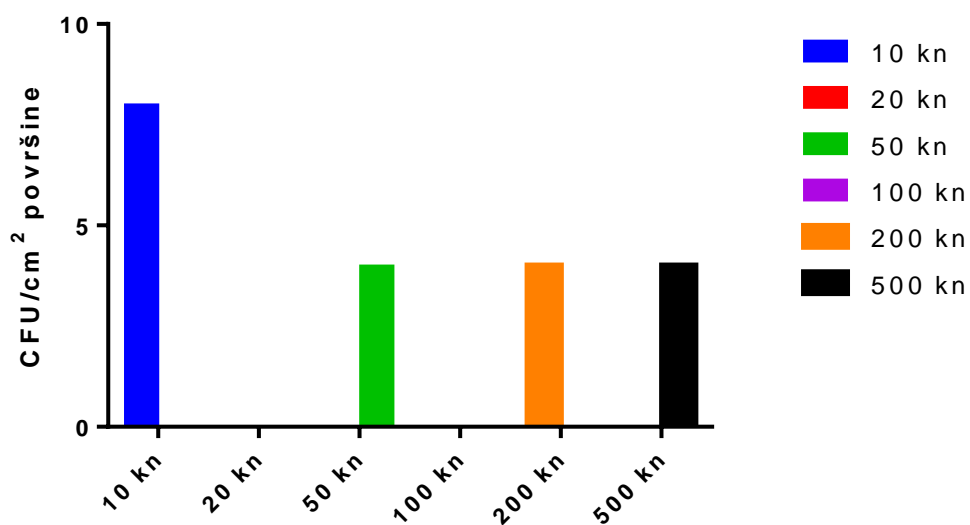


Slika 18 Broj aerobnih, mezofilnih bakterija na cm² ispitane površine

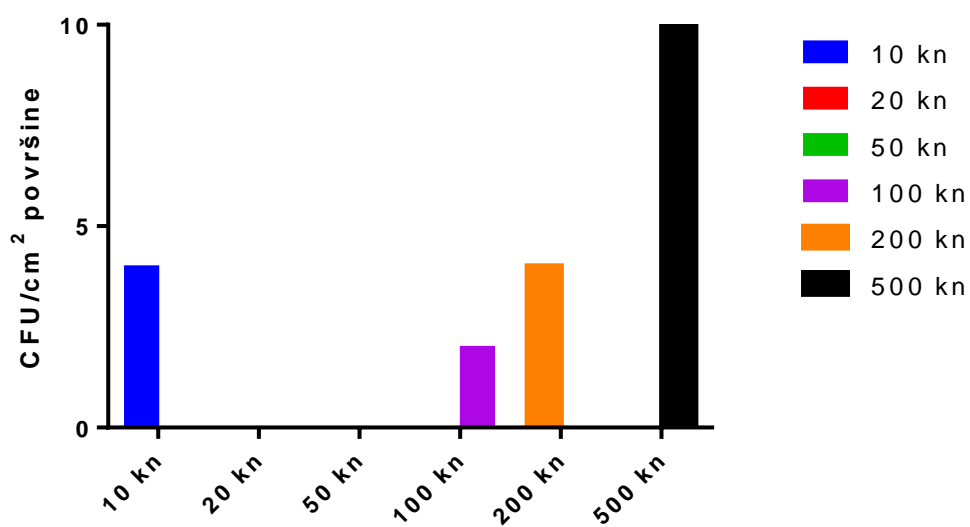


Slika 19 Broj plijesni i kvasaca na cm² ispitane površine

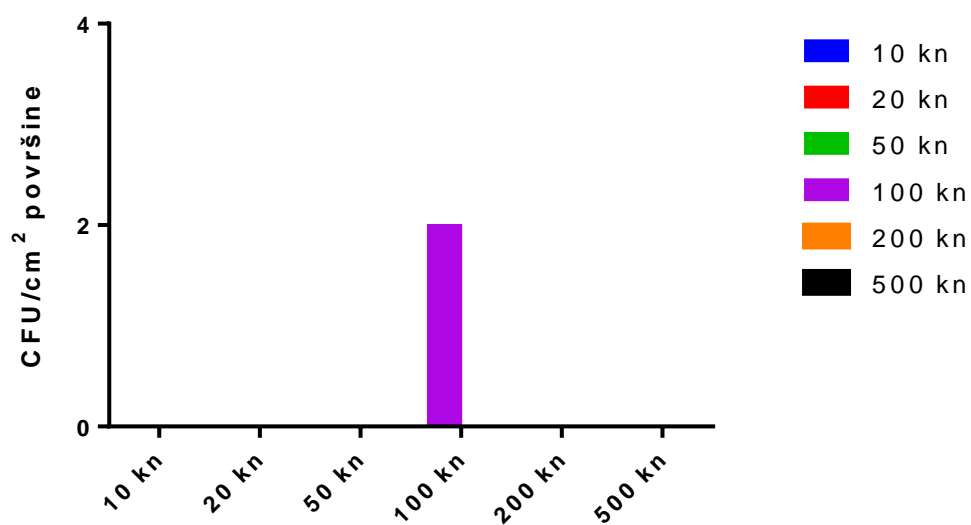
4.2. MIKROBNA POPULACIJA NA ANALIZIRANIM NOVČANICAMA



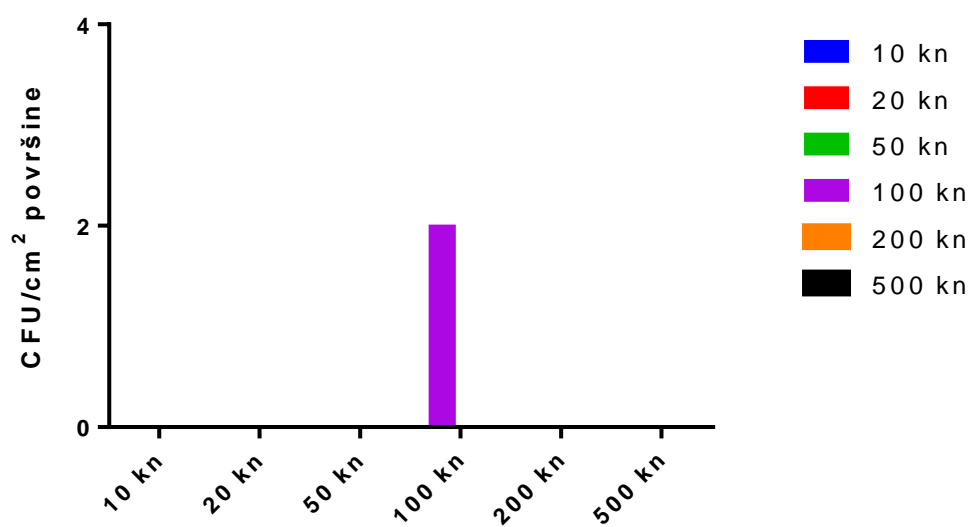
Slika 20 Broj bakterija roda *Enterococcus* na cm² ispitane površine



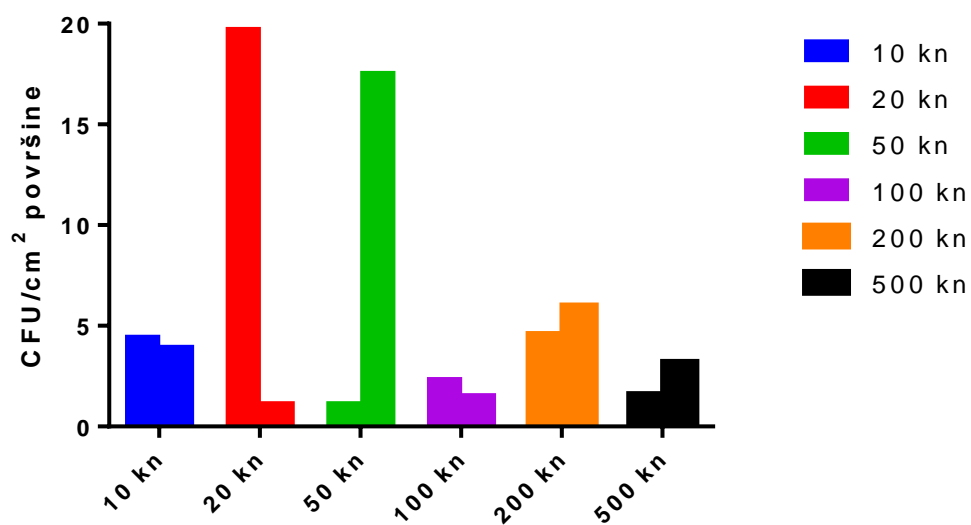
Slika 21 Broj bakterija vrste *Staphylococcus aureus* na cm² ispitane površine



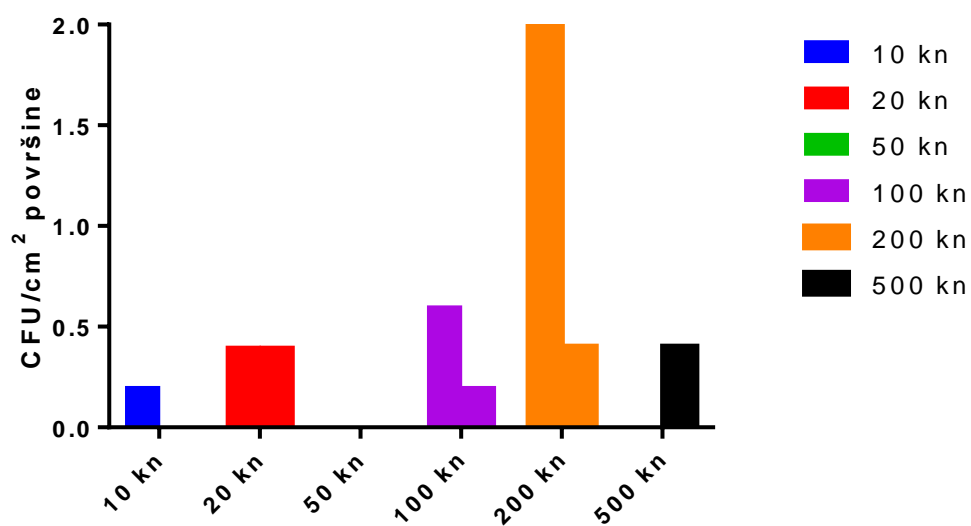
Slika 22 Broj enterobakterija na VRBG agaru na cm² ispitane površine



Slika 23 Broj koliformnih bakterija na VRBL agaru na cm² ispitane površine

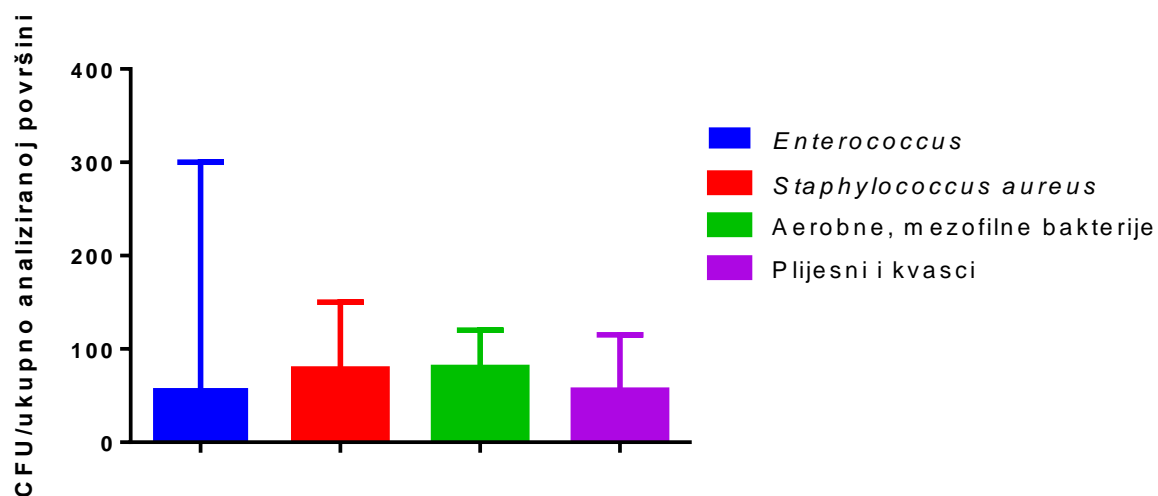


Slika 24 Broj aerobnih, mezofilnih bakterija na cm² ispitane površine



Slika 25 Broj plijesni i kvasaca na cm² ispitane površine

4.3. MIKROBNA POPULACIJA NA ANALIZIRANIM RAČUNALNIM TIPKOVNICAMA



Slika 26 Mikrobna populacija analiziranih računalnih tipkovnica

5. RASPRAVA

Mikrobna populacija sjedala na WC školjkama

Rezultati kontaminacije mikroorganizmima sjedala za WC školjke su prikazani **Slikama 14 – 19**. Zbog različitog načina obavljanja fiziološke potrebe – mokrenja, rezultati su podijeljeni u dvije skupine, žensku i mušku populaciju. U žena, uobičajen je sjedeći položaj tijekom mokrenja, što u muškoj populaciji nije slučaj (u tolikom postotku). Stoga je, posljedično, i očekivana mikrobna populacija drugačija. Broj bakterija roda *Enterococcus* (**Slika 14**) se kretao od 0 do 15 u ženske populacije i od 0 do 6 u muške. Enterokoki su fekalne bakterije, dakle primarno stanište im je feces. U slučaju obavljanja velike nužde, tijekom povlačenja vode i čišćenja, nastaje aerosol (zbog snažnog mlaza vode kojim se školjka čisti). Uslijed velike sile udarca na čestice fecesa na stijenkama, nastaju male kapljice vode, u kojima se nalazi fekalni materijal. Kako su ove kapljice teže (u usporedbi sa stanicama bakterija), dolazi do njihova taloženja u neposrednoj blizini izvora – na sjedalu WC školjke. Stoga je uputno prije povlačenja vode za ispiranje spustiti poklopac, jer će se smanjiti koncentracija aerosola. Različit rezultat između dviju populacija je i stoga što su uzorci uzimani iz WCa Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, na kojem studira više studentica, u usporedbi s muškom populacijom. Ovaj podatak, uz uobičajen način obavljanja fizioloških potreba, glavni je razlog različitih rezultata u ovom radu. Međutim, kako se na istraženoj površini (**Slike 14 – 19**) nalazi vrlo nisk broj koliformnih bakterija i enterobakterija, najvjerojatniji izvor bakterija roda *Enterococcus* je koža korisnika, budući bi veća kontaminacija fekalijama sigurno uzrokovala i otkrivanje većeg broja koliformnih bakterija, enterobakterija i, zasigurno, vrste *Escherichia coli*.

Bakterija vrste *Staphylococcus aureus* je stanovnik kože. Iako se, najčešće, nalazi na sluznici nosa, budući je halotolerantna (i gram-pozitivna) može se pronaći i na drugim dijelovima tijela. **Slika 15** prikazuje broj ove bakterijske vrste na analiziranoj površini. Potrebno je napomenuti kako je uzorkovanje površine sjedala provedeno metodom brisa na tri točke, te je, u rezultatima, prikazana srednja vrijednost izražena na 1 cm² površine. Tri mjesta uzorkovanja su odabrana stoga što se, na ovaj način, može točnije odrediti koji se mikroorganizmi nalaze na, relativno, velikoj površini sjedala. Rezultati broja *S. aureus* između populacija su nešto više ujednačeni, u usporedbi s enterokokima, iako je veći broj uzoraka u ženske populacije pozitivan na ovu bakteriju. Razlog tome je, najvjerojatnije, veća frekvencija uporabe sjedala, u usporedbi sa sjedalima koje koristi muška populacija. Na **Slikama 16 i 17** prikazani su rezultati koliformniha bakterija na VRBG i VRBL agaru. VRBL agar se koristi za koliformne bakterije (izvor ugljika je laktoza), dok se VRBGA koristi za određivanje prisutnosti i broja enterobakterija (izvor ugljika je glukoza). Vrlo niski brojevi ovih

bakterija (1,3 stanice na 10 cm² površine) sugeriraju kako je, ipak, kontaminacija sjedala fekalnim materijalom vrlo niska.

Sve površine koje su ispitane u ovom radu uključivale su i provjeru prisutnosti dviju važnih bakterijskih vrsta, porijeklom iz fecesa: *Escherichia coli* i *Salmonella* spp. Niti na jednoj od ispitanih površina (sjedala, tipkovnice, novčanice) nije utvrđena prisutnost ovih bakterijskih vrsta. Kako vrsta *E. coli* prevladava u fecesu, u usporedbi s ostalom fekalnom populacijom, da se radi zaista o kontaminaciji fekalnim česticama, sigurno bi porasla na hranjivoj podlozi (Endo agaru). Razlog tome je i što ova bakterija (iako nije sporogena) može preživjeti, izvjesno vrijeme, na različitim površinama (posebno pri vlažnim uvjetima) te uzrokovati križnu kontaminaciju drugih predmeta ili namirnica.

Bakterije roda *Salmonella* su, najčešće, brojčano manje zastupljene u fecesu, u usporedbi s *E. coli*, međutim, određivanje njihovog pristustva i broja je od iznimnog značaja na/u djelatnicima, predmetima opće uporabe ili hrani, stoga što uzrokuje gastroenteritis. Osobe koje su kliconoše ove bakterije ju šire u prostoru, stoga se moraju strogo pridržavati svih higijenskih standarda i ne sudjelovati u obradi ili manipulaciji namirnica, zbog opasnosti prenošenja bakterija na namirnice. Na analiziranim površinama nije utvrđena prisutnost bakterija roda *Salmonella*.

Aerobnim, mezofilnim bakterijama pripada mnogo različitih rodova i vrsta bakterija koje se nalaze u okolišu. Ove bakterije dobro rastu u temperaturnom rasponu od 20 do 37 °C, njihovo stanište je različito, uključujući i kožu, odjeću ili različite predmete. Neke od ovih bakterija mogu biti i patogene, iako je većina značajna prilikom čuvanja namirnica. Naime, dužim čuvanjem namirnica dolazi do povećavanja njihovog broja, te , nakon prelaska praga broja stanica, dolazi i do pojave prvih znakova kvarenja hrane. Određivanje broja ove skupine bakterija je od iznimnog značaja, stoga što njihov povećan broj upućuje na duže čuvanje hrane ili čuvanje pri neodgovarajućim uvjetima (npr. povišena temperatura). Kako se radi o velikoj skupini bakterija, neke od njih mogu biti metabolički vrlo aktivne i uzrokovati kvarenje namirnica. S radnih površina se prenose rukama ili priborom. Na **Slici 18** prikazan je rezultat broja ovih bakterija na analiziranoj površini. Kao što se može uočiti, ova skupina bakterija daleko prevladava broj svih ostalih istraženih bakterijskih skupina i vrsta. Stanište ovih bakterija je koža, odjeća te se, ovim putem, nanose na predmete i šire u okolišu. Najveći broj stanica je uočen u jednom uzorku na sjedalu koje je koristila muška populacija (127 stanica/cm²), dok je u ženske populacije taj broj iznosio 51 stanicu/cm². Prenosjenjem ove skupine bakterija na radne površine dolazi do ukupnog povećavanja bakterijske populacije i veće kontaminacije proizvoda, te i bržeg kvarenja.

Broj plijesni i kvasaca prikazuje **Slika 19**. U rezultatima mikrobiološke analize, prevladavali su kvasci, u usporedbi s poraslim kolonijama plijesni. Razlog tome je češće stanište kvasaca na koži, u usporedbi s plijesnima čije spore dospijevaju iz okoliša ili odjeće i predstavljaju prolaznu mikrobnu populaciju na koži. U ženskoj populaciji prisutnost kvasaca je češća zbog njihovog uobičajenog staništa – vaginalnog sustava. Nije utvrđena prisutnost patogenog kvasca vrste *Candida albicans*.

Mikrobna populacija novčanica

Papirnat i plastične novčanice su, vrlo često, optužene kao važan izvor mikroorganizama u našem svakidašnjem životu. Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bio istražiti mikrobnu populaciju papirnatih novčanica. U tu svrhu, za istražene su po dvije papirnat novčanice u apoenima 10, 20, 50, 100, 200 i 500 kn. Analizirana je površina od 25 cm² i broj mikroorganizama preračunat na 1 cm². **Slika 20** prikazuje broj bakterija roda *Enterococcus* na istraženim novčanicama. Najveći broj bakterija ovog roda je primijećen na novčanicama od 10 kn (8 stanica/cm²), dok je u ostalim (osim na površini novčanice od 20 kn gdje nije ustanovljen) broj ovih bakterija iznosio 4 stanice/cm².

Broj bakterija vrste *Staphylococcus aureus* (**Slika 21**) iznosio je od 10/cm² (500 kn) do 2 ili 4 stanice (100 kn; 10 i 200 kn). U ovom slučaju, očekivan je veći broj stanica, budući se radi o vrsti koja je stanovnik kože te se uporabom novčanica može značajno proširiti.

Broj koliformnih bakterija (**Slika 22**) i enterobakterija (**Slika 23**) je utvrđen samo na površini jedne novčanice od 100 kn. Izostanak vrste *Escherichia coli* i nizak broj koliformnih/enterbakterija upućuje na slučajnu kontaminaciju novčanica.

Slično kao i u slučaju prethodnih rezultata, najveći je broj aerobnih, mezofilnih bakterija (**Slika 24**). Pri tome se dvije novčanice ističu – jedna od 20 kn s 20 stanica/cm² i druga od 50 kn s 18 stanica/cm². Na ostalim analiziranim novčanicama broj stanica bakterija je gotovo identičan (oko 5 stanica/cm²).

Plijesni i kvasci su, na analiziranim novčanicama, zastupljeni u vrlo niskim brojevima stanica – najviše 2 stanice/cm² (novčanica od 200 kn). Ovako nizak broj upućuje na kontaminaciju iz okoliša (prašina npr.).

Iako se novčanicama intenzivno manipulira, izostanak vode (vlage) onemogućuje rast mikroorganizama. Dio mikroorganizama koji dospijeva s kože ili iz okoliša brzo odumire, što ih čini (barem one koje su istražene u ovom radu) relativno sigurnim u manipulaciji.

Mikrobna populacija računalnih tipkovnica

Računalne tipkovnice, ekrani osjetljiv na dodir i slični uređaji, posebno dostupni većem broju ljudi postaju vrlo zanimljivi, s mikrobiološkog stanovišta, kao jedan od mogućih izvora potencijalno patogenih mikroorganizama ili mikroorganizama uzročnika kvarenja. Za ovo istraživanje odabrane su tri računalne tipkovnice iz Knjižnice PTF-a Osijek te četiri računalne tipkovnice djelatnika PTF-a Osijek. Metodom briseva odabrane su tipke: A S D F J K L Č RAZMAKNICA ENTER BACK SPACE i rezultat broja mikroorganizama je izražen na njihovu ukupnu površinu. Od svih istraženih skupina mikroorganizama, utvrđena je prisutnost samo četiri skupine: *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, aerobnih, mezofilnih bakterija i plijesni i kvasaca (**Slika 26**). Očekivano je najveći broj mikroorganizama prisutan na površini tipkovnice u Knjižnici (velik broj korisnika) s 300 *Enterococcus*, 150 *S. aureus* 120 aerobnih, mezofilnih bakterijai 75 plijesni i kvasaca po ukupno analiziranoj površini, dok je na površini tipkovnice djelatnih PTF-a taj broj značajno manji. Povećan broj korisnika tipkovnica ili ekrana osjetljivih na dodir može značiti i veću kontaminaciju, stoga što svaka osoba nosi svoju mikrobnu populaciju, ali i posjeduje svoje osobne higijenske navike (koje se mogu značajno razlikovati od osobe do osobe) i tako utjecati na ostale korisnike istih uređaja. Nije utvrđena prisutnost koliforma, enterobakterija, bakterija vrste *E. coli* niti *Salmonella* sp.

Analizirane površine i predmeti opće uporabe u ovom radu upućuju na dobru higijensku praksu čišćenja (sjedala za WCe) bez obzira na velik broj korisnika. Novčanice i računalne tipkovnice istražene u ovom radu ne predstavljaju opasnost za korisnike. Ipak, bez obzira na rezultate istraživanja, potrebno se pridržavati higijenskih standarda, bilo u svakodnevnom životu ili u manipuliranju namirnicama.

6. ZAKLJUČCI

Prema rezultatima provedenog istraživanja, moguće je zaključiti:

1. Bakterije roda *Enterococcus* su češća mikrobna populacija na sjedalima koje koristi ženska populacija (15 stanica/cm²), u usporedbi s muškom (6 stanica/cm²).
2. Češća je prisutnost vrste *Staphylococcus aureus* na sjedalima WCa koje koriste žene, u usporedbi s muškom populacijom.
3. Broj koliformnih bakterija i enterobakterija je zanemariv na površini sjedala za WCe u obje populacije.
4. Aerobne, mezofilne bakterije su uočene u najvećem broju na sjedalu WCa muške populacije (127 stanica/cm²), dok je u ženske populacije prisutno gotovo tri puta manji broj stanica bakterija (50 stanica/cm²).
5. Plijesni i kvasci su na analiziranim sjedalima prisutni u zanemarivom broju.
6. Analizirane novčanice ne predstavljaju značajniju opasnost za zdravlje potrošača. Utvrđena je prisutnost do 10 stanica *Staphylococcus aureus*, 8 stanica *Enterococcus* i do 20 stanica aerobnih, mezofilnih bakterija/cm² površine. Ostale mikrobne skupine nisu prisutne u značajnijem broju.
7. Računalne tipkovnice koje koristi veći broj korisnika mogu predstavljati potencijalnu opasnost za zdravlje (300 stanica bakterija roda *Enterococcus* po ukupnoj površini).
8. Nije utvrđena prisutnost bakterija roda *Salmonella* niti vrste *Escherichia coli*.

7. LITERATURA

- Bhunias A: Foodborne Microbial Pathogens. Springer, USA, 2008.
- Bibek R: Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Boca Raton, 2004.
- Burton G: Microbiology for the Health Sciences. J. B. Lippincott Company, USA, 1992.
- Carrasco L, Morales-Rueda A, Garcia-Gimena R: Cross – contamination and recontamination by *Salmonella* in foods. Elsevier, 45: 545 – 556, 2012.
- Doyle M, Sperber W: Compendium of the Microbiological Spoilage of foods and Beverages. Springer, New York, 2009.
- Duraković S: Opća mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Duraković S: Primjenjena mikrobiologija. Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996.
- Goldman E, Green L: Practical Handbook of Microbiology. CRC Press, London, 2009.
- Jay J, Loessner M, Golden D: Modern Food Microbiology. Springer, USA, 2005.
- Lelieveld M, Mostert M, Holah J: Handbook of Hygiene control in the food industry. CRC Press, Boca Raton, 2005.
- Miliotis M, Bier J: International Handbook Of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, 2003.
- Moselio S: Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, USA, 2009.
- Riemann H, Cliver D: Foodborne Infections and Intoxications. Elsevier, Amsterdam, 2006.
- Spellman R: Industrial Hygiene Simplified. Government Institutes, Lanham, 2006.
- Talaro A, Talaro K: Foundations in Microbiology. WCB, Dubque, 1996.
- Weisglass H: Bakterije i bolesti čovjeka. Školska knjiga Zagreb, Zagreb, 1983.
- Weisglass H: Medicinska bakteriologija. Jumea, Zagreb, 1983.
- <http://albicans-candida.blogspot.com/2008/11/oi.html> [13. 04.2014]
- <http://blog.statefoodsafety.com/FoodIndustryBlog/?paged=7> [13. 04. 2014.]
- <http://www.cdc.gov/media/dpk/2013/dpk-untreatable.html> /media/dpk/2013/dpk-untreatable.html

[\[04.05.2014.\]](#)

<http://www.cnawater.com/WhatAreColiformsEColi.htm> [05. 05. 2014.]

http://inspectapedia.com/mold/Mold_Sprays.htm[07. 05. 2014.]

<http://lifescience.biomedal.com> [01.06.2014.]

http://sh.wikipedia.org/wiki/Herpes_simplex [05.06 2014.]

<http://www.cnawater.com/WhatAreColiformsEColi.htm>[05. 06. 2014.]

<http://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1524051>

<http://www.infectionlandscapes.org/2011/10/salmonellosis.html> [12. 07. 2014]

<http://www.microbeworld.org> [15.07.2014.]

http://www.musee-afrappier.qc.ca/fr/index.php?pageid=3111b&image=3111b_aureus [20.08.2014.]

<http://www.pallettruth.com/food-safety-risks/>[22.08.2014.]

<http://www.sealwizecoastal.com/why-seal-wood/> [23.08.2014]

<http://www.wisegeek.com/how-should-i-choose-between-a-wood-and-plastic-cutting-board.htm>

http://www.zzjzdnz.hr/hr/o_nama/rjecnik_pojmova[27.08.2014.]